

УДК 577.112.7:616-006.5/6

М.В.Вербова (4 курс, каф.ФХОМ), Б.А.Маргулис, д.б.н. (ИнЦ РАН)

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ УРОВНЯ ЭКСПРЕССИИ БТШ70 И ЕГО КОШАПЕРОНОВ В КЛЕТКАХ ОПУХОЛЕЙ ЧЕЛОВЕКА

Белки теплового шока (БТШ) играют важную роль в жизнедеятельности клеток. Они обладают выраженным защитным эффектом и способны защищать клетку от разнообразных токсических воздействий. Белки теплового шока были обнаружены практически во всех живых организмах, причем их экспрессия может увеличиваться при действии разнообразных стимулов, приводящих к денатурации белков или повреждению их структуры (тепловой шок, окислительный стресс, тяжелые металлы и др.) [1]. Экспрессия БТШ увеличивается также в ответ на многие патологические состояния, которые связаны с накоплением белков с нарушенной структурой (болезнь Хантингтона, Альцгеймера и др.)

Существует несколько семейств белков теплового шока, наиболее консервативным из них является семейство БТШ с молекулярной массой 70 кДа (БТШ70). БТШ70 был первым белком, который был назван молекулярным шапероном. Это означает, что он способен узнавать поврежденные, денатурированные или вновь синтезированные белки, не принявшие нативной конформации, тем самым препятствуя их агрегации. БТШ70 участвует в сворачивании белковых молекул, а также в их внутриклеточном транспорте [2]. В эукариотической клетке существует несколько представителей семейства БТШ70, которые локализованы в различных клеточных органеллах. В цитозоле эукариотической клетки есть 2 формы БТШ70: конститутивный БТШ70 и его индуцибельный гомолог.

Шаперонная активность – основное свойство БТШ70, помогающее ему осуществлять защитную функцию. Кроме поврежденных клеточных белков, БТШ70 может также взаимодействовать с различными сигнальными молекулами, участвуя таким образом в процессах клеточной жизнедеятельности, например в апоптозе (программированной клеточной смерти). БТШ70 может блокировать процесс апоптоза, в чем также проявляется его защитный эффект.

Выступая в качестве шаперона, БТШ70 связывается с субстратной белковой молекулой АТФ-зависимым образом за счет наличия у БТШ70 АТФазной активности. БТШ70 способствует сворачиванию поврежденного белка с помощью циклов связывания и освобождения субстрата, которые регулируются белками-помощниками – кошаперонами. Взаимодействие с кошаперонами влияет на шаперонную и АТФазную активность БТШ70. В клетке существует несколько семейств кошаперонов, которые способны взаимодействовать с БТШ70 и регулировать его активность.

Наиболее важными являются 2 семейства кошаперонов: семейство белков Hsp40/DnaJ и семейство белков Bag. Все члены семейства белков Hsp40/DnaJ (в том числе hdj-1) содержат консервативный J-домен, который взаимодействует с БТШ70 и стимулирует его АТФазную активность [3]. Кроме того, белок hdj-1 также обладает шаперонной активностью и способен защищать клетки самостоятельно. К семейству Bag относится антиапоптотический белок bag-1, который взаимодействует со многими клеточными белками, помимо БТШ70 [4]. Белок bag-1 обладает самостоятельным протективным эффектом. Bag-1 защищает клетки от апоптоза, способствует пролиферации клеток и опухолевому росту [5]. Связываясь с БТШ70, bag-1 выступает как фактор нуклеотидного обмена. В клетках человека есть несколько изоформ белка bag-1: Bag-1L, Bag-1M и Bag-1S. Наиболее распространен Bag-1S, но уровень экспрессии этих белков варьирует в зависимости от типа ткани.

Так как БТШ70 и его кошапероны взаимодействуют со многими сигнальными клеточными молекулами [6], то изменения количеств БТШ70 и белков-кофакторов в клетке могут приводить к изменению клеточного ответа на сигнал, в результате чего может произойти неконтролируемый клеточный рост, развитие злокачественности или клеточная смерть.

Целью данного исследования стало определение уровня БТШ70, hdj-1 и bag-1 в клетках опухолей человека (в основном уrogenитальной сферы). Вообще уровни содержания БТШ70 и его кошаперонов, а также их количественное соотношение в опухолевых клетках активно исследуются. Было показано, что во многих опухолях наблюдается повышенная экспрессия БТШ70 и bag-1 [4, 6]. Определение количества этих белков в опухолях различного гистогенеза имеет большое значение для анализа процессов формирования и развития опухоли, а также для выбора противоопухолевой терапии.

Мы получили моноклональные антитела к индуцибельному БТШ70 и к hdj-1, поликлональные антитела к белку bag-1, а также моноклональные антитела к актину. Опухолевые пробы были получены из городского онкологического диспансера. Анализ опухолевых клеток производился при помощи электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии SDS и последующего иммуноблоттинга. Пробы наносились в двух нагрузках для более точного определения уровня содержания исследуемых белков. Для демонстрации равного количества общего белка в пробе использовался актин.

Анализ клеток показал, что уровень содержания БТШ70 повышен во многих опухолевых клетках, причем его содержание в доброкачественных опухолях значительно меньше, чем в злокачественных. Уровень содержания белка bag-1 также повышен в клетках злокачественных опухолей, причем повышено процентное содержание изоформы белка bag-1L. Эти результаты коррелируют с данными, полученными другими исследователями.

Повышенное содержание БТШ70 и bag-1 в клетках делают их более устойчивыми. Многие противоопухолевые препараты запускают процесс апоптоза. БТШ70 и bag-1 обладают протективным и антиапоптотическим эффектом. Таким образом, повышение уровня этих белков является плохим прогностическим показателем для химиотерапии.

Нами впервые обнаружено повышение уровня содержания hdj-1 в клетках злокачественных опухолей. Это может иметь большое значение, так как hdj-1 тоже способен защищать клетки, как самостоятельно, так и за счет стимуляции активности БТШ70.

*Выводы.* По результатам исследования можно сделать предварительные выводы о повышении экспрессии БТШ70, bag-1 и hdj-1 в клетках опухолей, а также о корреляции между уровнем экспрессии этих белков и степени злокачественности опухолей.

#### ЛИТЕРАТУРА:

1. Маргулис Б.А., Гужова И.В. Белки стресса в эукариотической клетке // Цитология.-2000.-Т.42, №4.-С.323-338.
2. Hartl F.U., Hayer-Hartl M. Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein // Science.-2002.-V.295.-P.1852-1858.
3. Gebauer M., Zeiner M., Gehring U. Proteins interacting with the molecular chaperone hsp70/hsc70: physical associations and effects on refolding activity // FEBS Letters.-1997.-V.417.-P.109-113.
4. Takayama S., Krajewski S., Krajewska M., Kitada S., Zapata J.M., Kochel K., Knee D., Scudiero D., Tudor G., Miller G.J., Miyashita T., Yamada M., Reed J.C. Expression and location of hsp70/hsc70-binding anti-apoptotic protein bag-1 and its variants in normal tissues and tumor cell lines // Cancer research.-1998.-V.58.-P.3116-3131.
5. Takayama S., Xie Z., Reed J.C. An evolutionarily conserved family of hsp70/hsc70 molecular chaperone regulators // J.Biol. Chem.-1998.-V.274.-№2.-P.781-786.
6. Nollen E.A., Morimoto R.I. Chaperoning signaling pathways: molecular chaperones as stress-sensing 'heat shock' proteins // J. Cell Science.-2002.-V.115.-P.2809-2816.